

## ⑫ 公開特許公報 (A) 平4-30000

⑬ Int. Cl.<sup>6</sup>

C 07 K 15/12

識別記号

ZNA

序内整理番号

7731-4H

8717-4B

7236-4B

⑭ 公開 平成4年(1992)1月31日

C 12 N 15/00

5/00

A

B\*

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全21頁)

⑮ 発明の名称 組換ヒト肝実質細胞増殖因子

⑯ 特 願 平2-212818

⑰ 出 願 平2(1990)5月24日

⑱ 特 願 平2-134487の分割

優先権主張 ⑲ 平1(1989)6月5日 ⑳ 日本(JP) ㉑ 特願 平1-142697

㉒ 発 明 者 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号

㉓ 発 明 者 萩 屋 道 雄 滋賀県大津市陽明町3丁目4番地

㉔ 発 明 者 西 澤 勉 神奈川県相模原市富士見3丁目3-607

㉕ 発 明 者 關 達 也 滋賀県大津市北大路2丁目2番35号

㉖ 出 願 人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

㉗ 出 願 人 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号

㉘ 代 理 人 弁理士 高 島 一

最終頁に続く

## 明細書

## 1. 発明の名称

組換ヒト肝実質細胞増殖因子

## 2. 特許請求の範囲

(1) 組換ヒト肝実質細胞増殖因子。

(2) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を含有するDNA。

(3) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発現し得る組換発現ベクター。

(4) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発現し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体。

(5) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発現し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体を培養し、該培養液から組換ヒト肝実質細胞増殖因子を採取することを特徴とする組換ヒト肝実質細胞増殖因子の製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は肝実質細胞増殖活性を有するポリペプ

チド、さらに詳しくは、生体外 (*in vitro*) で肝実質細胞の維持、増殖を可能にする生理活性を有する新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、組換発現ベクター、形質転換体および該ポリペプチドの製造法に関するものである。

本発明のポリペプチドは肝実質細胞培養試薬、肝再生促進剤、肝機能の基礎的研究、肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究、肝癌の発癌研究用、さらに該ポリペプチドに対する抗体を用いる臨床診断試薬、肝疾患治療薬などへの利用が期待出来る。

## 〔従来の技術〕

従来、細胞増殖活性を有するポリペプチドとして、上皮細胞増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、神経細胞増殖因子 (NGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、血管内皮細胞増殖因子 (ECGF) などが知られている。これらの細胞増殖因子の他に、生体外において肝実質細胞増殖活性を有するポリペプチドが1984年に中村らによって再生肝ラット血清より部分精製

され、肝実質細胞増殖因子（以下HGFと略す）と命名された。

このHGFの発見まで肝実質細胞は、各種の幹細胞が活性に増殖する細胞外基質の存在下でも肝細胞の増殖が全く認められず、通常約1週間で培養容器の壁からの脱落が起こり、生体外での長期培養は不可能であった。ところが、このHGFの存在下において肝細胞は極めて良好に増殖し、該細胞の培養が可能となった（Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 1450, 1984）。他の研究者によると、このHGF活性は、肝部分切除手術後の血中、創瘻肝炎患者の血中にも存在することが確認された。その後、多くの研究者によって精製法、化学的性質、生物学的性質が明らかにされたが、このHGFあるいはHGFと同様の肝細胞増殖活性を有するポリペプチドのアミノ酸構造を同定するまでは至らなかった。

このような状況の下で、本発明者らは、先にラット血小板などの組織からHGFを分離精製して研究を重ね、この血小板由来のHGFは、2種の

サブユニットからなり、このHGFは生体外において肝実質細胞を極めて良好に増殖させることを見出すとともにHGFに含有される一部のアミノ酸配列27残基を同定することは成功した（特許昭63-311660号）。

#### 〔発明が解決しようとする課題〕

生体内HGFは、肝臓、腎、肺臓、骨盤、ひ臍、胎盤、腎臓などの臓器あるいは血小板や白血球などの血液細胞などから極少量分離されるポリペプチドであるため、原材料組織の入手、HGFの収量、安定供給など問題点が多い。このHGFを肝実質細胞の培養や肝細胞の研究用として利用するためには、その構造を明らかにしHGFあるいはHGFと同様な活性を有するポリペプチドを遺伝子組換技術を応用して大量に供給することが望まれている。

#### 〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、上記課題を解決すべく既更研究を重ねた結果、ラット肝臓mRNAより調製したcDNAライブラリーより、ラット血小板由來の

3

4

HGFのアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、ラットHGF $\beta$ 鎖ポリペプチドをコードする塩基配列を含むcDNAが得られることを見出した。さらに、ラット由来の該cDNAの全部あるいはその一部をプローブとして、ヒト肝臓mRNAより調製されたcDNAライブラリーよりヒトHGFポリペプチドをコードする塩基配列を含むcDNAが得られることを見出した。また、ヒトの肝臓以外の臓器や血球細胞のcDNAライブラリーよりヒトHGF cDNAが得られることも見出した。さらに、該cDNAを含有する組換発現ベクターによって形質転換された形質転換体、該形質転換体を培養してヒトHGF遺伝子が発現することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は組換ヒト肝実質細胞増殖因子、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を含むcDNA、該cDNAを発現し得る組換発現ベクター、該組換発現ベクターで形質転換された形質転換体および該形質転換体を培養し、該

培養物から組換ヒト肝実質細胞増殖因子を採取・製造する方法である。

本発明のヒト肝実質細胞増殖因子をコードするcDNA、組換発現ベクター、および形質転換体は、例えば次のようにして調製される。

すなわち、(1)ラット肝細胞やラット巨核球などの動物組織よりmRNAまたは染色体DNAを単離し、常法に従ってcDNAライブラリーまたは染色体DNAライブラリーを作製し、(2)合成オリゴヌクレオチドプローブ、あるいは抗体を用いて動物、例えばラットのHGFのcDNAまたは染色体DNAを単離するため、上記動物、例えばラット由来のcDNAライブラリーまたは染色体ライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローナー目的とするcDNAまたは染色体DNAを抽出し、この動物、例えばラット由来のHGFのcDNAまたは染色体DNAをプローブとして、ヒトの臓器あるいは血球細胞などのmRNAより調製したcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローナー目的とす

るヒト由来HGFのcDNAを抽出する。また、本発明によって明らかにされたDNA配列あるいはヒトや動物のHGFのアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドや本発明により得られたヒトHGF cDNAやヒトHGF染色体DNAなどをプローブに用い、またヒトまたは動物のHGFに対する抗体を用い、直接ヒトの臓器あるいは血液細胞などから抽出したmRNAより調製したcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローンより目的とするヒト由来のHGFのcDNAを抽出することもできる。(3)このヒト由来HGFのcDNAよりヒトHGFをコードするcDNA断片を制限酵素を用いて切り出し発現用ベクターに組み込み、(4)得られた組換発現ベクターにより宿主細胞を形質転換して形質転換体を得、(5)この形質転換細胞を培養して、その培養上清から本発明のヒトHGFを採取・製造することが出来る。さらに形質転換細胞中の組換発現ベクターから制限酵素処理によって本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含有するD

NAを得ることが出来る。

以下、本発明の各工程について詳細に説明する。  
①mRNAの単離とcDNAライブラリーの調製  
動植物、例えばラットまたはヒトのHGFをコードするmRNAはラットなどの動物またはヒトの肝臓、腎臓、心臓、肺臓、筋肉、骨髄、胎盤などの臓器あるいは白血球、巨核球やリンパ球などの血漿細胞などから各自得ることが出来る。例えば、*Biochemistry*, 18, 5294 (1975) に記載されているJ. M. Chingvinらの方法によって、ラットなどの動物またはヒトの臓器あるいは血漿細胞のアガニジンチオシアン酸溶液から得たRNAをさらにオリゴ(dT)セルロースカラムを用いる液体クロマトグラフィに付すことによって該mRNAを調製することが可能である。

また、ヒト肝、脳、胎盤、白血球などのmRNAのような動物細胞や動物組織などの各種mRNAは、市販品としてクロントック社などから購入して利用することも出来る。

これらのmRNAを酵素として逆転写酵素やボ

リメラーゼ・チェーン・リアクション法(PCR)を用いて、例えばH. Okayamaらの方法(*Mol. Cell. Biol.*, 2, 161, 1982、および*Mol. Cell. Biol.*, 3, 280, 1983)あるいはU. Gublerらの方法(*Gene*, 25, 263, 1983)あるいはM. A. Frohmanらの方法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998, 1988)に従ってcDNAを合成し、このcDNAをプラスミドやファージなどに組み込むことによりcDNAライブラリーを調製することが出来る。cDNAを組み込むプラスミドベクターとしては、大腸菌由来のpBR322(東洋紡織)、pUC18およびpUC19(東洋紡織)、枯草菌由来のpUB110(シグマ社)などがある。またcDNAを組み込むファージベクターとしては、λgt10およびλgt11(東洋紡織)などがある。これらのベクターは、宿主細胞内に保持されて複製、増幅されるものであれば、ここに例示したものに限定されるものではない。

mRNAを酵素として合成されたcDNAをプラスミドまたはファージに組み込んでcDNAラ

イブライラーを調製する方法として、T. Maniatisの方法(*Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory*, 1982, p. 239)またはT. V. Hyunらの方法(*cDNA Cloning: A Practical Approach*, 1, 49, 1985)を各々示すことが出来る。また、mRNAと同様に各種のcDNAライブラリーを市販品としてクロントック社などから購入することが出来るのでそれらを利用することも出来る。

#### (2)cDNAライブラリーのクローニング:

cDNAライブラリーとして得られたプラスミドやファージなどの組換発現ベクターは、大腸菌のような適切な宿主細胞に保持される。宿主となり得る大腸菌としては、例えばEscherichia coli NM514, C600(ストラタジーン社)、NM522, JM101(ファルマシア社)などを例示することが出来る。cDNAのベクターがプラスミドの場合、塩化カルシウム法、塩化カルシウム・塩化ルビジウム法などを用いて、またcDNAのベクターがファージの場合、インビトロバックエーリング法などを用いてあらかじめ増殖させ

た宿主細胞に保持させることが出来る (Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 248)。

このようにして得られた形質転換体から、ラットなどの動物またはヒトの肝実質細胞増殖因子の部分のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、このオリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>P標識して、プローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション法 (Gene, 10, 63, 1980)、ブラークハイブリダイゼーション法 (Science, 196, 180, 1977)などによって cDNA クローンを釣り上げることが出来る。また、目的とするポリペプチドに対する抗体を用いて、標準抗体法 (DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49, 1985)によって、cDNA クローンをクローニングすることも可能である。このようにしてクローニングされた形質転換体は、ラットなどの動物またはヒト由来の HGF の全アミノ酸配列あるいはその部分のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する cDNA を含有している。

Aを合成し、上記と同様にして cDNA ライブライマーから、すでに導かれた第1の cDNA に連結しうる第2の cDNA を含有するプラスミドやファージなどの組換 DNA をクローニングすることが可能である。このプライマーエクステンションとクローニングの工程は、必要により複数回繰り返される。

### (3)ヒトHGF組換発現ベクターの構築：

クローニングされたヒト HGF のアミノ酸配列の全部あるいはその一部をコードする cDNA を含有する数種のプラスミドやファージなどの組換ベクターから制限酵素によって cDNA を切り出し、ヒト HGF の発現に適したベクターのプロモーターの下流に制限酵素と DNA リガーゼを用いて再結合して組換発現ベクターを作製することが出来る。

より詳しくは、本発明のヒト HGF を効率良く発現させるために組換発現ベクターは転写の下流方向に順番に必要により(1)プロモーター、(2)リボソーム結合部位、(3)開始コドン、(4)本発明のヒト

次に該形質転換体から常法 (Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982) に従ってプラスミドやファージなどの組換 DNA を単離し、そのまま、あるいは制限酵素で消化してから cDNA 塩基配列が決定される。最初に得られたラットなどの動物またはヒト由来の cDNA をプローブとして、同様の方法によってヒトの臍器あるいは直接細胞由来の mRNA から調製された cDNA ライブライマーのクローニングを行うことが出来る。得られたラットなどの動物あるいはヒト由来の HGF の cDNA の塩基配列は、マクサムとギルバートの化学法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977) やサンガーのジデオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977) などによって決定される。さらに、必要があれば、記述の mRNA と塩基配列の決定された cDNA の一部あるいはその cDNA の一部の配列を合成した DNA をプライマーにしてプライマーエクステンション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 731, 1979) によって新たに cDN

11

12

HGF をコードする塩基配列を含有する DNA、(5)終止コドン、(6)ターミネーターを含むように構成される。

本発明で用いることが出来る DNA のベクターとして、大腸菌由来のプラスミド pBR322, pUC18 (東洋紡績)、枯草菌由来のプラスミド pUB110 (シグマ社)、酵母由来のプラスミド pRBL15 (ATCC 37062)、バクテリオファージ λgt10、λgt11 (ストラタジーン社)、ウイルス SV40 (BRL 社)、BPV (ATCC VR-703)、レトロウイルスの遺伝子由来のベクターなどが列挙出来るが宿主内で複製・増幅可能なベクターであれば特に限定はない。特に、本発明のヒト HGF を簡単に発現させるには、SV40 のようなウイルスの遺伝子由来のベクターを用いるのが好ましい。

例えば、前述のクローニングされたヒト HGF をコードする DNA を SV40 ベクターの後期領域に結合した組換発現ベクターは、COS 細胞 (Cell, 23, 175, 1981) と呼ばれるサル細胞株に導入して

13

—866—

14

発現させることが可能である。

プロモーターおよびターミネーターに関する限り、目的とするヒトHGFをコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特に限定はない。例えば、プロモーターとして、宿主が大腸菌である場合、*t r p*プロモーター、*l a c*プロモーターなどを、宿主が枯草菌である場合、*S P 0 1*プロモーター、*S P 0 2*プロモーターなどを、宿主が酵母である場合、*G A P*プロモーター、*P G K*プロモーターなどを、宿主がマウス雄雛芽細胞やチャイニーズハムスター卵巣細胞のような動物細胞の場合、ウイルス由来の*S V 4 0*プロモーターや*H S V 1*TKプロモーターあるいはメタロチオネインプロモーターやヒートショックプロモーターなどを例示することが出来る。またターミネーターとしては、宿主が大腸菌の場合、*t r p*ターミネーター、*I P P*ターミネーターなどを、宿主が枯草菌の場合、*a m y F*ターミネーターなどを、宿主が酵母の場合、*C Y C 1*ターミネーターなどを、宿主が動物細胞の場合、*S V 4 0*

ターミネーター、*H S V 1*TKターミネーターなどを例示することが出来る。これらのプロモーターとターミネーターは用いる宿主に応じて適切に組み合わされる。

本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含むDNAは、そのDNAが発現されるポリペプチドが、肝実質細胞増殖活性を有するならば特に制限はなく、例えば後述する第4図に示した塩基配列が例示され、さらには上記塩基配列の一部が置換、欠損、挿入、あるいはこれらが組み合わされた塩基配列を有するDNAであってもよい。本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含むDNAの翻訳開始コドンとしてATG、翻訳終止コドンとしてTAA、TGA、あるいはTAGを有してもよい。また必要に応じて開始コドン、あるいは終止コドンを1つ以上組み合わせたり、他のコドンと組み合わせて配列してもよく、これらに特に限定はない。さらに、この組換発現ベクターで形質転換した宿主の選択マーカーとなり得るアンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐

性遺伝子、DHFR遺伝子など1種または2種以上が該ベクターの適切な位置に含有されていることが好ましい。

#### (4)宿主細胞の形質転換とその培養：

このようにして構築されたヒトHGF組換発現ベクターは、コンビテント細胞法(*J. Mol. Biol.*, 53, 154, 1970)、プロトプラス法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1929, 1978)、リン酸カルシウム法(*Science*, 221, 551, 1983)、DEAEデキストラノン法(*Science*, 215, 166, 1982)、電気パルス法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7161, 1984)、インビトロパッケージング法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 581, 1975)、ウイルスベクター法(*Cell*, 37, 1053, 1984)、またはマイクロインジェクション法(*Exp. Cell. Res.*, 158, 347, 1984)などによって宿主に導入され、形質転換体が作製される。このとき、宿主として既述の大腸菌の他に、枯草菌、酵母、動物細胞などが用いられる。特にマウス雄雛芽細胞C127(*J. Virol.*, 26, 291, 1978)やチャイニーズハ

ムスター卵巣細胞CHO(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216, 1980)などの哺乳動物由来の宿主細胞を用いるのが好適である。

得られた形質転換体は、目的とする組換ヒトHGFを産生させるためにその宿主に応じた適切な培地で培養される。培地中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物、ビタミン、血清および薬剤などが含有される。培地の1例としては、形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB培地(日本製薬)、M8培地(*J. Exp. Mol. Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, New York*, 1972, p.431)などを、宿主が酵母の場合、YEPD培地(*Genetic Engineering, Vol. I, Plenum Press, New York*, 1978, p.117)などを、宿主が動物細胞の場合、2.0%以下のウシ胎児血清を含有するMEM培地、DMEM培地、RPMI1640培地(日本製薬)などを挙げることが出来る。形質転換体の培養は、通常20°C~45°C、pHは5~8の範囲で行われ、必要に応じて通気、攪拌が行われる。また、宿主が接着性の動物細胞などの場合

は、ガラスピーズ、コラーゲンピーズ、あるいはアセチルセルロースフォローファイバーなどの担体が用いられる。これら以外の培地組成あるいは培養条件下でも形質転換体が生育すれば実施でき、これらに限定されるものではない。

#### 15 ヒトHGFの精製：

このようにして形質転換体の培養上清中または形質転換体中に生成した組換ヒトHGFは、公知の塩析法、溶媒沈降法、透析法、膜外離過法、ゲル電気泳動法、あるいはゲル通過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィなどを組み合せて分離精製することが出来る。特に、硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、ヘパリンセファロースアフィニティクロマトグラフィ、およびフェニルセファロース逆相クロマトグラフィの組み合わせ、あるいは硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、および抗HGF抗体セファロースアフィニティクロマト

グラフィの組み合せなどが好ましく有効な精製法である。

以上述べた方法によって得られた新規な組換ヒトHGFは、ラット肝およびラット血小板由来HGFと同様にラット肝実質細胞の増殖を顕著に促進する活性を示した。

#### (HGF活性の測定)

HGF活性は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7229 (1983) に記載の方法に準じて次のように測定した。ウイスター系ラットからコラーゲナーゼ還流法によって肝実質細胞を分離精製した。得られたラット肝実質細胞を5%ウシ血清、 $2 \times 10^{-3}$ Mインスリンおよび $2 \times 10^{-4}$ Mデキサメサンを添加したウイリアムズE培地（フローラボラトリーソ）に懸濁し、24ウエルマルチプレートに $1.25 \times 10^4$ 個/ウエルの濃度で播いた。5%CO<sub>2</sub>および30%O<sub>2</sub>および65%N<sub>2</sub>の存在下、37°Cで20時間培養後、0.1μg/mlのアブロチニンを添加したウイリアムズE培地に交換すると同時に所定量の被験試料を添加した。

19

20

15時間後、1.5μCi/mlの<sup>35</sup>S-デオキシリジン1.0μCi/ウエルを添加した。コントロール群には、<sup>35</sup>S-デオキシリジン添加の15分前に5μg/mlのアフィディコリンを添加した。さらに6時間培養して<sup>35</sup>Sでラベルした。細胞をpH7.4のPBSで2回洗浄後、約1.0%トリクロロ酢酸水溶液(TCA)で固定した。細胞を1ウエル当たり0.5mlの1N水酼化ナトリウム水浴槽で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の1部をとってローリー法(J. Biol. Chem., 256, 1951)に従い蛋白量を測定した。被験試料を添加したとき肝実質細胞に取り込まれた<sup>35</sup>Sの量をコントロールとのカウントの差として求め、これをラット肝実質細胞蛋白質1mg当たりに換算して、DNA合成活性(dpm/mg蛋白質)とした。被験試料のHGF活性は、同一試験において上皮細胞成長因子(EGF)1.0ng/mlを用いた時の肝実質細胞のDNA合成活性の50%に相当する活性を1単位と定義して表示した。

#### (発明の効果)

本発明によれば、肝実質細胞の生体外での増殖を可能とする新規な生理活性ペプチドが提供される。本発明の組換ヒトHGFは、臨床検査試薬や肝疾患治療薬として有用である。さらに本発明の組換ヒトHGFの作用により増殖維持される肝実質細胞は、例えば肝機能の基礎的研究用、肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究用肝癌の発癌研究用、あるいは肝炎ウイルスの生体外培養のための宿主細胞として極めて有用である。

以下、本発明を実施例により、さらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### (実施例)

##### 実施例1

###### (1)ラット肝臍mRNAの単離：

ラット肝臍mRNAは、グアニジンチオシアント酸法(Biochemistry, 18, 5294, 1979)によって抽出し、オリゴdAセルロースカラムクロマトグラフィ法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80,

1406, 1972) によって精製して調製した。市販食用核酸抽提液で希釈した 2.0% 四塩化炭素を S-D ラット 1.0 Cg 当たり 1 ml を腹腔内投与した。四塩化炭素投与の 1 時間後、肝臓を摘出した。得られたラット肝臓 0.60 g に 5.5 M クアニジウム溶液 (5.5 M クアニジンチオシアニン酸、2.5 mM クエン酸、0.5% ラウリルザルコシンナトリウムからなる pH 7.0 の溶液) 1.6 ml を加えてホモジナイズした。0.1 M EDTA を含むセシウムトリフロロ酢酸溶液 (1 g/ml) 1.7 ml に上記のラット肝分離液 1 ml を重層し、ベックマン超遠心機、L 8-55 型によって 85000 g、20 時間、20°C の条件下で遠心分離した。DNA 層を除去した後、沈降した RNA 層を 1 ml の滅菌した蒸留水に溶解した。この RNA 水溶液から冷エタノール沈澱によって 6.24 mg の RNA を得た。得られた RNA を 1 mM EDTA を含む 1.0 mM ト里斯塩酸緩衝液 (pH 7.5) (以後、TE 緩衝液と略す) 0.5 ml に溶解し、65°C、5 分加熱処理した後、1M NaCl 溶液 0.5 ml を加えた。0.1 N

23

保存した。この cDNA は、cDNA クローニングシステム λgt10 (アマチャム社) を用いて Huynh らの方法 (DNA Cloning I, a practical approach, 1, 49, 1982) に準じ、次のように λgt10 の Eco RI 部位にクローニングした。Eco RI メチラーゼを用いて上記の cDNA 溶液の 2.0 μl をメチル化した後、T4 DNA リガーゼを用いて cDNA の両末端に Eco RI リンカーを付加した。過剰のリンカーを Eco RI 削化し、約 1.00 μl の反応液を得た。STE 緩衝液で平衡化した cDNA 精製用ゲル通過カラムに上記反応液 1.00 μl を注入した。STE 緩衝液で溶出して cDNA 面分 5.00 μl を集めた。常法によってエタノール沈澱を 2 回繰り返した後、減圧乾燥してリンカー付加 cDNA を得た。再び、STE 緩衝液に溶解して 5.0 ng/μl のリンカーフ付加 cDNA 2.6 μl を調製した。あらかじめ準備された λgt10 アーム 1 μg にリンカーフ付加 cDNA 0.1 μg を T4 DNA リガーゼを用いて挿入した。この反応液は冷エタノール処理した

NaOH で活性化した後、0.5 M NaCl および 1 mM EDTA を含む 1.0 mM ト里斯塩酸緩衝液 (STE 緩衝液と略す) で平衡化したオリゴ dT セルロースカラムに RNA 溶液 0.5 ml を注入した。約 0.5 ml の STE 緩衝液で洗浄後、TE 緩衝液で吸着したポリ(A) RNA を溶出した。このポリ(A) RNA 溶液 5.00 μl から冷エタノール沈澱によって得られたポリ(A) RNA は、再び TE 緩衝液に溶解し、1 μg/μl の濃度に調製した。

(2) ラット肝由来の cDNA ライブライマーの作製

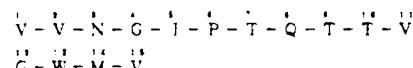
上記(1)で得られたポリ(A) RNA、5 μl を試型として cDNA 合成システム・プラス (アマチャム社) を用いて Gubler らの方法 (Gene., 25, 263, 1983) に準じて cDNA を合成した。1 本鎖 cDNA の収量は、1.018 ng、2 本鎖 cDNA の収量は、1.728 ng であった。この 2 本鎖 cDNA は、フェノール/クロロホルム (1:1, v/v) 抽出とエタノール沈澱によって精製した後、STE 緩衝液に溶解し、約 0.7 μg/20 μl の濃度に調製してから使用するまで -20°C で

24

後、軽く乾燥し、得られた組換 DNA の全量を 5 μl の TE 緩衝液に溶解した。この組換 DNA をインビトロパッケージング反応に供し、λgt10 組換ファージを得た。ファージプレーティング用大腸菌を用いたタイトレーションにより測定した cDNA 1 μg から得られた組換ファージ数は、 $5.0 \times 10^4$  倍であった。このようにして作製した cDNA ライブライマーは、使用するまで少量のクロロホルムを加えた STE 緩衝液 (100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, および 0.01% ゼラチンを含む 20 mM ト里斯塩酸緩衝液、pH 7.5) 中、4°C で保存した。

## (3) DNA プローブの合成:

本発明者が見出した下記ラット HGF B 頭 N 末端アミノ酸配列 15 個



(式中、V はバリン、N はアスパラギン、G はグリシン、I はイソロイシン、P はプロリン、T はトレオニン、Q はグルタミン、W はトリプトファン、M はメチオニンを示す)

25

-869-

26

をコードする塩基配列を推定し、オリゴタクレオチド

' ACCATCCA(CC)ACIGTIGT  
TGIGTIGGIAT(C)CCITTAC(A  
C)' (Iはイノシンを表す)

をDNAシンセサイザー381A(アプライドバイオシステムズ社)により合成した。得られたオリゴタクレオチドをディポリタクレオチドキナーゼ(東洋精薬)を用いて [ $\alpha^{32}P$ ] ATP(アマチャム社)により標識してDNAプローブを作製した。

#### (4)ラットHGF遺伝子DNAの部分単離とその塩基配列の決定

上記(2)で得られた約  $5 \times 10^4$  個の組換ファージを37°Cで15分間約  $8 \times 10^4$  個の大腸菌NM514(ストラタジーン社)に感染させた後、約50°Cで加温した0.7%の寒天を含むLB培地 $270\text{ ml}$ に添加し、 $23\text{ cm} \times 23\text{ cm}$  のLB寒天培地プレート6枚に均一に流延した。空气中、37°Cで12時間培養後、ブラークの生じたプレート

上にニトロセルロースフィルターを約30秒間密着させた。このニトロセルロースフィルターを1.5M NaClおよび0.1N NaOHからなるアルカリ溶液に5分間浸漬し、さらに0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、2.5mMリソ酸緩衝液(pH7.5)、2mM EDTAおよび2×SSC緩衝液からなる中性溶液に15分間浸漬した。風乾後、60°C、2時間熱処理してニトロセルロースフィルターに各ブラークのDNAを固定化した。得られたニトロセルロースフィルターは、6×SSC緩衝液、5×デンハート溶液、5.0 mM PIPES、および1.0 mMリソ酸緩衝液、pH7.0、からなるハイブリダイゼーション溶液に浸漬し、65°Cで5時間前処理した。100°Cで5分間熱処理した上記(3)の [ $\alpha^{32}P$ ] 標識合成オリゴタクレオチド(約  $8 \times 10^4$  cpm)プローブとサケ精巣DNA(0.1 mg/ml)の混合溶液を添加し、45°Cで16時間ハイブリダイゼーション反応を行った。反応後、ニトロセルロースフィルターは50°Cで0.1% SDSを含む6×SSC緩衝液に

27

よって3回洗浄してから風乾した。このニトロセルロースフィルターを増感スクリーン、ライトニングプラス(デュポン社)とX線フィルム、RX(富士写真フィルム)に密着させ、-80°Cで30時間露光した。得られた3個の陽性ブラークを採取し、上記と同じ方法によって2次スクリーニングを行い、得られた1個の陽性クローンをRBC1と命名した。このRBC1ファージを常法により増殖させ、RBC1cDNAを単離精製した。得られたcDNAの塩基配列は、シーケネース(ユナイテッドステートバイオケミカル社)を用いてジデオキシ法によって決定した。第1回にRBC1cDNAの全塩基配列を示す。RBC1cDNAは、ラットHGFβ鎖をコードする塩基配列(I番目から688番目)を含有する。

#### (5)ヒトHGF遺伝子DNAの単離と塩基配列の決定:

ヒト正常肝臓mRNA(クロンティック社)5μgを模型にして上記(2)と同様にしてヒト肝由来のcDNAを合成した。1本鎖cDNAの収量は、

28

1100 ngであった。得られたcDNAの200ngをアガロース電気泳動に供し、分画した4~7kbのcDNAをジーンクリーン(バイオ101社)で抽出した後、上記(2)と同様にしてcDNAライプラリー(I)を調製した。cDNA 1μgから $2 \times 10^4$  個の組換ファージを得た。マルチプライムDNA標識システム(アマチャム社)を用いて [ $\alpha^{32}P$ ] dCTPで標識したRBC1cDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーション反応温度および洗浄温度を60°C、洗浄液は0.1% SDSを含む2×SSC緩衝液とした以外は(4)と同様に、ヒト肝由来cDNAライプラリー(I)の1次スクリーニングおよび2次スクリーニングを行い、陽性クローンHBC25を得た。HBC25ファージから常法により単離、精製したHBC25cDNAを塩基配列解析および制限酵素切断解析に供した。第2回目にHBC25cDNAの制限酵素地図、第3回目にHBC25cDNAの塩基配列の一節を示す。次にHBC25cDNAに含有する'TCATAATCTT

29

30

TCAAGTCT' の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを cDNA シンセサイザー 381A (アプライドバイオシステムズ社) により合成した。この合成 DNA 0.75 μg をプライマーとして、ヒト肝 mRNA 20 μg を酵母として cDNA 0.4 μg を合成し、同様にして cDNA ライブライナー (II) を複製した。この cDNA ライブライナー (II) から ( $\alpha^{32}P$ ) dCTP で標識した HBC 25 cDNA の 0.7 kb EcoRI 断片をプローブにして陽性クローニング HAC 18 を得た。第 2 図に HAC 18 cDNA の制限酵素地図、第 3 図に HAC 18 cDNA の塩基配列の一部を示す。このようにして得られた HBC 25 cDNA および HAC 18 cDNA の塩基配列を組み合わせたヒト HGF コード領域の全塩基配列およびその塩基配列から演繹されるアミノ酸配列を第 4 図に示す。ヒト HGF の全 cDNA 塩基配列から、ヒト HGF の翻訳開始コドンは 1 番目の ATG であり、終止コドンは 2185 番目の TAG と推定される。これらの開始および終止コドンの間のヒ

HGF の cDNA 塩基配列は 728 アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードし、1 番目の Met に続くアミノ酸配列は His に富み、21 番目の Gly までが HGF 分離のためのシグナル配列であった。同様にヒト HGF B 領の N 末端は、495 番目の Val と推定される。また、ヒト HGF の娘鎖の結合部位は、Asn-x-Ser/Thr のアミノ酸配列を有する 294 番目、402 番目、566 番目、および 653 番目の Asn かと推定される。

第 4 図に示すヒト HGF のアミノ酸配列をコンピューターによりホモロジー検索を行った結果、ヒト HGF はプラスミノーゲン、プラスミン、カリキュレインや凝固因子 XII などのセリンプロテアーゼとホモロジーをもつことが見出された。即ち、ヒト HGF はその C- 領にクリンギル構造と推定される配列を 4 脳所持っており、またその B- 領は上記セリンプロテアーゼのプロテアーゼ領域に類似している。しかし、セリンプロテアーゼの活性中心と推定されている Ser と His がヒ

## 31

HGF の B- 領では Tyr (673 番目) と Gln (534 番目) にそれぞれ置換されている。  
(6) サル COS 細胞用ヒト HGF 発現ベクターの構築：

サル COS 細胞用ヒト HGF 発現ベクター pEUK [hHGF I] の構築図を、第 5 図に示す。上記(5)で得られた HAC 19 ファージ DNA を制限酵素 BamHI と SacI で消化し、アガロース電気泳動により 0.8 kb の DNA 断片を分離・精製した。同様に HBC 25 ファージ DNA を制限酵素 SacI と SmaI で消化し、2.1 kb の DNA 断片を分離・精製した。これらの DNA 断片をあらかじめ制限酵素 BamHI と SmaI で消化したブルースクリプト KSM 13+ (ストラタジーン社) と混合し、T4 DNA リガーゼで結合してプラスミド pBS [hHGF I] を得た。得られた pBS [hHGF I] を制限酵素 XbaI と SmaI であらかじめ消化した COS 細胞用発現ベクター pEUK-C1 (クロンティック社) と 3.0

## 32

kb DNA 断片を混合し、T4 DNA リガーゼで結合してヒト HGF 発現ベクター pEUK [hHGF I] を得た。

(7) サル COS 細胞の形質転換とヒト HGF 遺伝子の発現：

得られた pEUK [hHGF I] プラスミドをニタノール沈殿した後、1.0 mM PBS 酸性液に溶解し、2.0 μg/ml に調製した。次に、10% ウシ胎児血清 (ギブコ社) を含む DMEM 培地 (日本製薬) 中で増殖させた対数増殖期の COS-1 細胞 (ATCC CRL-1650) を 1.0 mM PBS 酸性液で 2 回洗浄した後トリプシン処理した。同様衝液で 3 回洗浄後、細胞濃度  $2 \times 10^7$  個/ml になるように再び同様衝液に浮遊化した。先に調製したプラスミド溶液 250 μl と細胞浮遊液 250 μl を混ぜし、氷冷下で 10 分間放置した。この氷冷したプラスミド・細胞混液に高電圧パルス導入装置 ZA-1200 (PDS 社) を用いて、印加電圧 4 kV/cm、パルス時間 20 ミリ秒の条件下で高電圧パルスをかけた。得

られた細胞を上記の培地で希釈し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下にて3日間培養した。培養3日目の培養上清中のHGF活性を前述のラット肝実質細胞を用いて測定したところ、50単位/mlであった。

一方、HGF cDNAを挿入していない表現ベクター、pEUK-C1を同じ方法によりCOS-1細胞に導入して培養したが、その培養上清中には、HGF活性を認めなかった。

#### 実施例2

##### (1)マウスC127細胞用ヒトHGF表現ベクターの構築

マウスC127細胞用ヒトHGF表現ベクター pBPMT(hHGFII)の構築図は、第6図に示す。実施例1で得られたHAC19ファージDNAを制限酵素BamHIとScaIで消化し、アガロース電気泳動により0.9kbのDNA断片を分離・精製した。同様にHBC25ファージDNAを制限酵素ScaIとPstIで消化し、2.1 kbのDNA断片を分離・精製した。これらのD

NA断片をあらかじめ制限酵素BamHIとPstIにて消化したプラスミドpESII-（ストラタジーン社）と組合し、T4 DNAリガーゼで結合してプラスミドpES(hHGFII)（開拓研究会第11回CEC号）を得た。プラスミドpBPMTを制限酵素EcoRVで消化後、細胞内アルカリフェヌカルボキシテラゼ(BAP)でリン酸基を除去した部位に、プラスミドpES(hHGFII)（開拓研究会第11回CEC号）を制限酵素XbaIとSalIとNaeIで消化しT4 DNAリガーゼで平滑末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した3.0kbのDNA断片をT4 DNAリガーゼにより挿入した。得られたヒトHGF表現ベクターpBPMT(hHGFII)は、MT-1プロモーターとSV40初期遺伝子のポリ(A)付加シグナルの間にヒトHGF遺伝子を有し、この表現ベクターによるマウスC127細胞の形質転換は、ウシバピロマウイルス(BPV)遺伝子により行われる。また形質転換された細胞の選択は、トランスポゾンTn5のneo

35

遺伝子(Gene 19, 327, 1982)にヘルペスシンブルックスウイルスタイプ1のチミジンキナーゼ(HSV-1 TK)遺伝子由来のプロモーターとポリ(A)付加シグナルを連結したneoキメラ遺伝子によっても可能となる。

##### (2)マウスC127細胞の形質転換とヒトHGF遺伝子の発現：

ヒトHGF表現ベクターpBPMT(hHGFII)は、Wiglerらの方法(Cell, 11, 223, 1977)によりマウスC127細胞へ導入した。

上記(1)で得られた20μgのpBPMT(hHGFII)プラスミドを0.5M塩化カルシウム240μlに溶解し、2.0mM HEPES、2.0mM NaClおよび1.5mMリン酸ナトリウムからなる2×HEPES緩衝液(pH7.1)、240μlを攪拌しながら加えた。室温で30分攪拌を続けプラスミドとリン酸カルシウムの共沈殿を形成させた。あらかじめ、10%ウシ胎児血清(ギブコ社)および1.0mMケルタミンを添加したDMEM培地(E水製薬)を用いて5×10<sup>5</sup>個の

36

C127細胞を5%CO<sub>2</sub>の存在下で37°C、24時間培養した。培地交換した後、プラスミドとリン酸カルシウム共沈殿を加え、室温で20分放置した。さらに37°Cで4時間インキュベートした後、培地を除去し、15%グリセリンを添加した1×HEPES緩衝液を加え室温で5分放置した。培地で細胞を洗浄した後、培地交換し、さらに37°Cで2時間インキュベートした。細胞を10倍に希釈して1ml/瓶のG418(シグマ社)を含む同培地を用いて5%CO<sub>2</sub>の存在下で37°C、7日間培養して形質転換細胞を得た。得られた細胞株から培養上清中のHGF活性の高い細胞を限界希釈法でスクリーニングしヒトHGF高産生株BPH89を得た。この細胞の培養上清中のHGF産生能は、2.3万単位/ml/日であった。

#### 実施例3

##### (1)チャイニーズハムスターCHO細胞用ヒトHGF表現ベクターの構築

チャイニーズハムスターCHO細胞用ヒトHGF表現ベクターpEVSV(hHGFII)の構

37

—872—

38

図は、第7図に示す。プラスミドpEVSVを新規酵素EcoRVで消化後、酸性アルカリフィスファターゼ(BAP)でリン酸基を除去した部位に、実験例2で得られたプラスミドpBS(hHGFII)(農工研育成第11050号)を新規酵素XbaIとSalIとNheIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した3.0 kbのDNA断片をT4 DNAリガーゼにより挿入した。得られたヒトHGF発現ベクターpEVSV-E(hHGFII)は、SV40初期プロモーターとSV40の初期遺伝子のボリ(A)付加シグナルの間にヒトHGF遺伝子を有する。また、形質転換された細胞の選択は、マウスDHFR遺伝子にSV40初期プロモーターとボリ(A)付加シグナルを連結したDHFRキメラ遺伝子により可能となる。

#### (2)チャイニーズハムスターCHO細胞の形質転換とヒトHGF遺伝子の発現:

ヒトHGF発現ベクターpEVSV-E(hHGF

II)は、実験例2と同様にしてチャイニーズハムスターCHO細胞のジヒドロ型酸還元酵素(DHFR)欠損CHO-DHFR細胞に導入した。得られた細胞株は、リボタクレオンドとデオキシタクレオンドを含まず、透析した1.0%ウシ胎児血清(ギブコ社)と1%グルタミンと5.0 mMジソトレキセートを含むα-MEM培地(フローラボラトリーソ)を用いて培養した。発生したコロニーは、安定なヒトHGF高産生株を得るために、同培地において18世代まで増殖させた。得られた細胞株は、安定にヒトHGFを産生し、CHO-1と名付けた。この細胞のヒトHGF産生能は、3.1万単位/1/日であった。

#### 実験例4

実験例2で得られたヒトHGF産生マウスC127組換細胞株BHP88の培養上清液より粗製ヒトHGFを精製した。

#### (1)陽イオン交換クロマトグラフィー

BHP88株の培養液400 mlに、終濃度0.01%となるようにTween 80を添加し、ステリベク

38

40

スHVフィルター(日本ミリポア・リミテッド)により滤過した。この滤液に1/20容のIMTris-HCl(pH8.5)緩衝液を加え、緩衝液A(5.0 mM Tris-HCl、1.0 mM Hepes、2 mM CaCl<sub>2</sub>、1.50 mM NaCl、0.01% Tween 80、pH8.5)で平衡化したS-セファロースFF(ファルマシア社製、カラムサイズ内径1.6 cm、高さ5 cm)に添加した。緩衝液Aで未吸着物質を洗浄後、0.15 Mから1.0 MのNaClによる直線濃度勾配(全量100 ml)で、吸着物を溶出した。クロマトパターンを第8図に示す。HGF活性をもつ画分を集め、ヘパリン溶出液とした。

#### (2)アフィニティクロマトグラフィー

S-セファロース溶出液を1 N酢酸でpH7.5に調整後、2倍容の0.01%Tween 80を含む蒸留水で希釈し、緩衝液B(1.0 mM Tris-HCl、0.3 M NaCl、0.01%Tween 80、pH7.5)で平衡化したヘパリン・セファロースCL-6B(ファルマシア社製、カラムサイズ内径

1 cm、高さ3 cm)に添加した。緩衝液Bでカラムを洗浄後、0.3 Mから2.0 MのNaClによる直線勾配(全量3.0 ml)により溶出した。そのクロマトパターンを第9図に示す。HGF活性をもつ画分を集め、ヘパリン溶出液とした。

#### (3)逆相HPLC

0.1%TFA(トリフルオロ酢酸、v/v%)を含む蒸留水で平衡化したC4-RP-304カラム(バイオラッド社製、内径4.6 mm、高さ250 mm)にヘパリン溶出液を添加し、0.1%TFAを含む0%から80%へのアセトニトリルの濃度勾配により溶出を行った。粗製ヒトHGFは約40%のアセトニトリル濃度にて溶出させた。そのクロマトグラムを第10図に示す。精製された粗製ヒトHGFの収量は約2.5 μgであり、培養上清液からの活性回収率は約2.5%であった。

#### (4)SDS-Pオリアクリルアミド電気泳動

前記3段のクロマトグラフィーで精製された粗製ヒトHGFを2-メルカプトエタノール還元下及び非還元下SDS-Pオリアクリルアミド電気泳

41

—873—

42

動にかけた。結果を第1図に示す。精製組換ヒトHGFは、非還元条件下(2-ME(-))では分子量7万~8万の単一バンドを示し、還元条件下(2-ME(+))では、分子量6万~7.5万のα鎖と分子量3万~4万のβ鎖に分かれた。即ち、組換HGFはα鎖とβ鎖からなるヘテロダイマーであることが示された。またβ鎖が2本のバンドに分離し、β鎖に付加される基質の本数に差があることを示した。

## (5) α鎖およびβ鎖のN末端アミノ酸配列

精製組換HGFのα鎖とβ鎖を分離し、それぞれのN末端アミノ酸配列を調べた。精製標品を4Mグアニジン存在下にて60°C、30分間処理し、2-MEカルボキシエタノールにて還元した。次いでモノヨード酢酸ナトリウムを添加して、SH基をアルキル化し、反応液をマイクロポンダスフェア-C4カラム(ウォーターズ社)による逆相HPLCにかけ、α鎖とβ鎖を分離した。溶出は0.1%TFAを含む水とアセトニトリルによった。このようにして得られたα鎖とβ鎖をプロティンシ

ークエンサーにかけた結果、下記に示すアミノ酸配列が得られた。

α鎖	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	His	Lys	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Phe	Lys	Lys	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Ile

β鎖	1	2	3	4	5	6	7
	Val	Val	Asn	Gly	Ile	Pro	Thr

これらの配列は第4回のHGFコード領域の全塩基配列より推定されたアミノ酸配列の32~51番目および495~501番目に一致した。

## (6)アミノ酸組成および構成

精製組換HGFを0.2%フェノールを含む6N HClにて110°C、24時間処理して加水分解し、アミノ酸分析機にかけ、アミノ酸組成を調べた。その結果は下表に示したように、DNA塩基配列より推定したアミノ酸組成値と精製組換標品による実測値は非常によく一致した。

(以下余白)

蛋白質1mol当たりの各アミノ酸数		
アミノ酸	DNA配列からの計算値	実測値
Lys	47	46
His	24	24
Arg	43	42
Asp	85	80
Thr	41	38
Ser	38	38
Glu	60	56
Pro	45	43
Gly	57	57
Ala	22	22
Cys	40	( )
Val	33	35
Met	15	17
Ile	40	37
Leu	38	38
Tyr	32	31
Phe	18	19
Trp	18	( )

(実測値の( )はこの分析方法では測定できないことを意味する。)

さらに精製組換HGFを2.5N-TFA中で、110°C、6時間加熱処理し、陰イオン交換樹脂を用いたHPLCにて糖分析を行った。その結果、アスパラギン配糖体特有のマンノース、ガラクトース、フコース、N-アセチルガラクトサミンが検出され、組換HGFは糖蛋白質であることが確認された。

## (7)組換ヒトHGFの肝細胞増殖活性

ラット初代培養肝実質細胞は、現在知られているin vitroの系の中では最もin vivoに近い肝機能を持つ系である。「HGF活性の測定法」に記述した方法に従って得たラット肝実質細胞に対し、精製した組換ヒトHGFを添加したところ、1ng/mlの濃度で強い細胞増殖を誘起し、10ng/mlでその効果は最大に達した。この培養系に増殖活性を示す因子は他にもインスリンやEGFがあるが、組換ヒトHGFは単独で両者よりも強い活性を有し、かつこれら3者の共存下では相加的な作用を示した。従って、組換ヒトHGFは現在知られている因子のなかでは、生体外肝細胞に対し最も強力な増殖活性をもつ物質といふことができる。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、RBC1cDNAの塩基配列を示す。第2図は、HBC25cDNAの制限酵素地図(a)およびHAC1BcDNAの制限酵素地図(b)を示す。第3図は、HBC25cDNAの塩基配列の一部(c)及びHAC1BcDNAの塩基配列の一部

16)を示す。第4図は、ヒトHGFコード領域の全塩基配列とアミノ酸配列を示す。第5図は、サルCOS細胞用ヒトHGF発現ベクターの構造図を示す。第6図は、マウスC127細胞用ヒトHGF発現ベクターの構造図を示す。第7図は、チャイニーズハムスターCHO細胞用ヒトHGF発現ベクターの構造図を示す。第8図は、S-セファロース溶出液のフラクションと溶出成分の吸光度およびそれらのDNA合成活性との関係を示す線図である。第9図は、ヘパリン溶出液のフラクションと溶出成分の吸光度およびそれらのDNA合成活性との関係を示す線図である。第10図は、逆相HPLCにおいて、過酸化したアセトニトリル濃度と、溶出した成分の吸光度との関係を示す線図である。第11図は、精製粗縫ヒトHGFの還元下および非還元下でのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動パターンを示す。

特許出願人 東洋紡織株式会社

同 中村 敏一

代理人 弁理士 高島 一

47

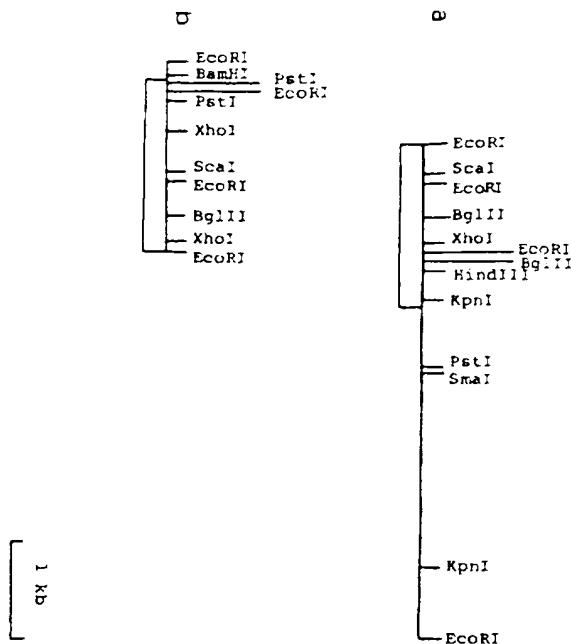
```

GAATT CCGTGTCAAGC GTTGGGATTC GCACTACCCC -481
CACAAAGCATG ACATCACTCC CGAGANCTTC AAATGCAAGG ACCTTAGAGA AAATTATTGC -421
CGCAATCCGG ATCGGGCTGA ATCACCATGG TGTGTTACCA CTGATCCAAA CATCCGACTT -361
GCTTACTGCT CTCAAATTCC CAAATGTGAC GTGTCAGTG GACAAGATTG TTATCGTGGC -301
ATGGGAAAAAA ACTACATGGG CAACTTATCC AAAACAAAGGT CTGGACTTCAC ATGTTCCATG -241
TGGGACAAAGA ATATGGAGGA TTACACCGT CATACTTCT GGGAGCCAGA CGCTAGCAAG -181
TTGACTAAGA ATTACTGCCG GAACCCCCAT GACCGACGCCG ATGACCTTG GTGCTACACA -121
GGAAATCCCTC TCGTTCTTG GGATTATTGC CCTATTTCCTC GTTGTGAAGG AGATACTACA -61
CCTACAAATTC TCAATTGGG CCATCCCTGTA ATATCCTGTC CAAACACAAA ACAACTCCGA -1
GTTGTAATG GCATTCACAC ACAACACAACTGAGG TGCGCTGGA TGGTTAGTT GAAATACAGG 60
ATAAAACACA TCTGTGGGGG ATCATTGATA AAGGAAAGGT GGTTCTTAC TCCAGGCAA 120
TGTTTCCAG CTAGAACACA AGACTTGAA GACTATGAG CTTGGCTTGG AATCATGAT 180
GTCCATGAGA GAGGGAGGA GAAACGCAA CAGATCTTAA ACATTTCCCA GCTAGTCTAT 240
GCACCTGAAG GCTCAGATTG GTTGTACTG AACCTTGCTC GCCCTGCAAT CCTGGATAAC 300
TTTGTCAAGTA CAATTGATT ACCTAGTTTAC GGCCTGACAA TCCCTGAAAA GACTACTTGC 360
AGTATTTCAGG GCTGGGGCTA CACTGGATTC ATCAACCCGAT ATGTTTATT ACCAGTAGCT 420
CATCTGTATA TTATGGGAA TGAGAAATGC AGTCAGCACC ATCAAGGCAA GGTGACTTTG 480
AATGACTCTG AATTATGTGC TGCGGCTGAA AAGATTGGAT CAGGACCTTC TGAGGGAGAT 540
TATGGTGGCC CACTCATTTG TGAACACAC AAAATGAGAA TGGTTCTTGG TGTCATTGTT 600
CCTGGTGGCTG GATGTGCCAT CCCAAATGCT CCTGGTATTG TTGTTGAGT ACCATTTAT 660
GCAAAATGGA TACACAAAGT AATTGACA TACACACTGT AATAGCCATA GAAGAGGCCA 720
GTGTATTTGA AGCATCCATG GATACAGGAA GATTCCAAG ACTTCAGGAT TAAAATGTC 780
CCTAAACAA TCCTAAAACA ACTACTTGAC TGTGTTGAGT GTTCAGATAC TCATTAATAT 840
ATGTGGCGTT TTCTGTTGAA AAAAAAAA AAAAAAAGAA TTC

```

第14図

第2図



AACCAATC	CAGAGGTAC	CTACGAAGTC	600	
TGTGACATT	CTCACTGTT	AGAAATTCAA	TGCATGACCT	660
GCTCTCATGG	ATCATACAGA	ATCAGGCCAG	GCATGCGGCA	720
CACCGGCACA	ATTCATGCC	TGAAAGATAT	GACTGGCATCA	780
CCGANTCCCG	ATGGCCAGCC	GGGGCCATGG	TGCTTATACU	840
GAGTACTCTG	CAATTAAAAC	ATGCCCTGAC	ATGACATGTA	900
GAACAACTG	ATATCATCCA	AGGTCAAAGGA	GAAGGCTACA	960
TGGAATGGAA	TTCATGTCA	GGGTGGGAT	TCTCAGTATC	1020
CCTGAAATT	TCAAGTGCAA	GGACTCTACGA	GAATAATTACT	1080
GAATCACCTG	GGTGTTTAAC	CACTGATCCA	AAACATCCGAG	1140
CCAAACTCTG	ATATGCAAA	TGACAAAGAT	TGTTATCGTG	1200
GCCAACTTAT	CCCCAAACAG	ATCTGGACTA	GGATGGCAA	1260
GACTTACACE	GTCTATCTT	CTGGGAAACCA	GATGCAAGTA	1320
CGAAATCCAG	ATGATGATGC	TCATGCCC	AGCTGAATGA	1380
JGGGATTATT	CCCTTATTTC	TCGTTGTGAC	CGGAAATTC	1440
GACCATCTTC	TAATATCTTG	GGGAAANACCC	ACTCATGCG	1500
ACACGAACAA	ATGTAGGATG	GAATGATTAGT	GAATAAAACCA	1560
GGATCATIGA	TAAGGAAAG	TTGGGTCTT	ACTGCACGAC	1620
TTGAAAGATT	ATGAGGCTTG	GCCTGGATT	ACTGTTCCC	1680
CCCAACACCG	TCTCAATGT	CTCCGACCTG	TTCTCGAGAC	1740
TIAATGAAGC	TTGCCAGACC	TGCTGTCTG	GTATATGCC	1800
AAATATGGAT	GTATTTTGT	GATGATTITG	CTGAAACAT	1860
GGATTGATCA	ACTATGATGG	TCTTATACGA	GGGCTACACT	1920
AAATGAGCC	ACCATCACCC	GGGAAAGGTS	AACTGAAAT	1980
GCTCAGAAAGA	TTGGATCAGG	ACCATGTEAG	AGCTCTGGG	2040
CAACATAAAA	TGAGAAATGT	GGGATTATG	TTGCCCCACT	2100
AATGCTCTC	GTATTTTGT	ATTTGCCCC	GGCTGGATG	2160
TIAACATATA	AGGTACCCACA	GTCTACCTG	CGCCATTC	2220
CAACTGTCTT	TTACATGAGG	AACTGCAAT	GGGAAATGAC	2280
TCTTAAGACA	ACTACTGGAG	ATGTCGAAT	AAATATACCA	2340
TTTCGTTGTT	TTTGTGTTGTC	ACTGTTATTG	CTTACATGTC	2400
CAACTGTAGT	ACATATCTC	TGCAAGATAC	TTATGGCTGT	2460
ATTGCTGGAT	AAAGATTGTT	TGGGAAAAAA	AACTAATTAAT	2520
GGTGGGTTTC	TTAATAATGT	CTAACCCATA	AACTAAATGT	2580
AATTTATACC	TTGCTGCTCT	AAATTGTAAC	CTTATTTAAC	2640
TATATGTTAT	AGTCTATICA	TTCTCTTC	CCATGTATCC	2700
ACACTTTTTA	CAAAACACACA	TACCCATGTA	GGTACACATG	2760
ACAGTTTAA	TTATGATGTA	CTTAAATGTA	TACATGCACT	2820
AGTTTACCI	CAAAATATAA	GAATCTCTA	AAAGCCAGTA	2880
AAATCAAAA	TGAGTGGCTA	ATTCTCCATA	GAATATTAIA	2940
CACTTACCT	GTGGCCATCA	CGTAATCTGC	AAATGATGCT	

第3図(a)

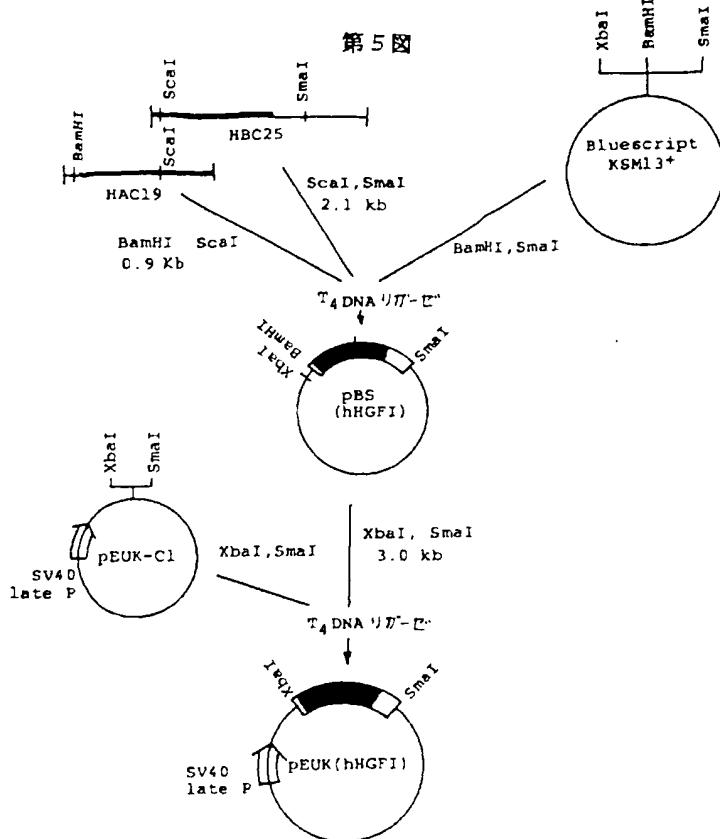
图 4 图(1)

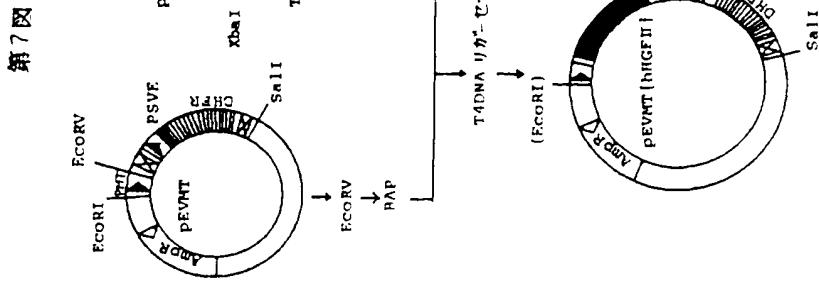
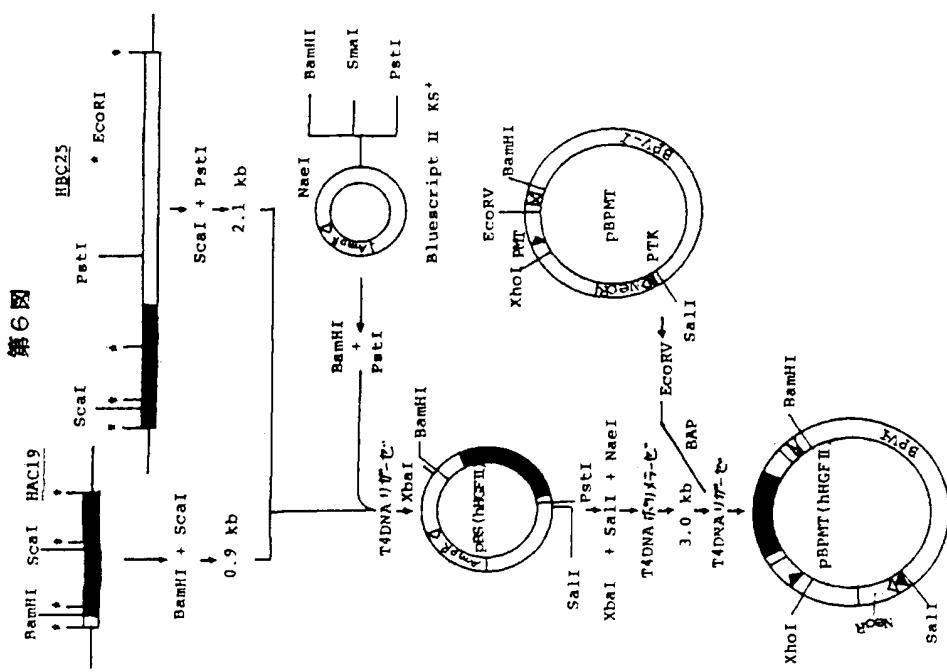
GGATCC	CGAGCCGTC	CAGGAGACC	-	ATG TGC GTC ACC AAA CTC CTC CCA GCC CTC CTC CTC CAG CAT GTC CTC	4R
ATGGGAGA	CCAAACTCTC	GGCAGGCCG	1	Met Thr Val Thr Lys Ser Leu Pro Ala Leu Leu Glu His Val Ile	
CTGCTCCC	CTGGTCAGC	ATGTCCTCT	60	S 10	
CTGCTCCC	TCGCCATCC	CTAGCCATAG	65	CTG CAT CTC CTC CCC ATC CCC TAT GCA GAG GGA CAT	
GAACTCAA	AATCAGAA	GGACATRAGA	120	Leu His Ile Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu His	
GAACTCAA	AATCAGAA	GACTACCTA	180	25	
ACCCAGAG	TGATATGTG	AGAACATGTG	240	AAG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAC GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT	
CTATCACT	GGAGGGCTT	TGTTTGAT	245	Lys Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Ser Ala Lys Thr	
TTCATAGCA	TGTCATGTC	AGCTATGCT	300	45	
ACCCAGAG	ACATAGAA	GGATTTGCA	360	ACC GTC ATC ATA ATA GAT CGA GCA CTC AAC ATA AAA ACC AAA AAA GIG	
ACCCAGAG	ACATAGAA	CTCCATGCA	420	Thr Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Iys Val	
TCAATCAT	AGAGGGCAT	CAATGTCG	480	50	
ACCTTTC	CTTCAGCTA	CGATGATCC	485	ACT GCA GAC CAA TGT GCT ATT AGA TGT ACT AGG ATT ATT GGA CTT	
CGAGGGAG	AAGGGGAC	CTGGCTTC	540	Asn Thr Ala Asp Glu Cys Ala Asn Asn Asn Cys Thr Asn Asn Glu Leu	
TGTCATTC	CTCACTTC	ACAGGGCAT	600	80	
GGTCATCG	ATCATACAA	ACAGTGTTC	660	CCA TTC ACT TGC AAG GGC TTT GTT CAT AAA EGG AGA AAA CAA TGC	
GGTCATCG	ATCAGGAA	ATTCGGTAC	720	Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Leu Lys Glu Cys	
CACCGCCAA	AATTCTGCC	TCAGAGAT	780	85	
CGGATCCG	ATGGCCACCC	GAGCCATGC	840	CTC TTC CCC TTC AAT ATG ATG TCA AGT GGA GTG AAG AAA GAA TTT	
GAATCTTG	CAATTAAAC	TGCTATAC	900	Leu Trp Thr Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Glu Val Lys Lys Glu Phe	
GAACAACTG	ATGGCTCA	AGCTCTAA	960	105	
TGGATGGAA	TTCAGCTCA	GGGGACATGC	1020	GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC	
CCTGAAATT	TGAGTGGCA	GGACCTACG	1080	Gly His Ile Asp Leu Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys	
GAATACCC	GGCTTTCAC	CACTGATCA	1140	120	
CCAAACTGG	ATATGCAA	TGCAAGATG	1200	ATC ATC AAA TCT CAG CCC AGT TCC ATT ATA CCA CAC GAA CAC	
GGCAACTT	CCAAACAG	ATCTGCACT	1260	Ser Gly Ile Lys Cys Glu Pro Trp Ser Ser Met Pro His Glu His	
GAETTACAC	GTCTATCT	CTGGGACCA	1320	160	
CGAAATCCG	ATGATGATC	TGATGACCC	1380	AGG TTT TTG CCT TCG AGC TAT CGG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC TAG	
TGGGATTAT	GGCTTATTC	TGTTGCAAC	1440	Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Ile Glu Ile Asp Leu Glu Glu Asp Tyr	
GACCATCTG	TAATATCTG	GGCTGATCAA	1500	175	
ACACGAAACA	ATGAGGATG	GGTTGATCAA	1560	TCT CGA AAT CCT CGA GGG GAA GAA GGG GAA CCC Trg Tgt Ttc The Thr Ser	
CGATCAATGA	TAATGAGAC	TGAGATACA	1620	Cys Asn Pro Arg Ile Glu Glu Glu Cys Asp Ile Pro Trp Cys The Thr Ser	
TGAAAGATT	ATGA	TGTTGAGAC	1680	185	
ATTCGA	GAG GAA	CCG TAC GAA GTC TGT GAG ATT CCT CAG TGT TCA GAA	200		
Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Glu Cys Ser Glu	195				

图 4 图(2) ~ 图(4)

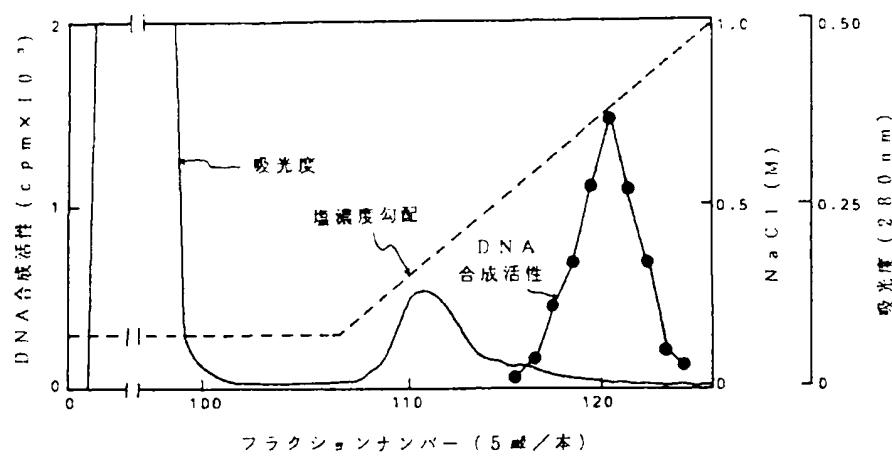
Str 4 (S12)	Str 4 (S3)
GAT GAA TGC ATG ACC TCC MAT GGG GAG ACT IAT CGA CGT CTC ATG DAT Val Glu Cys Met Thr Cys Arg Glu Ser Tyr Asp Glu Leu Met Asp 210 215	AAG AAC ATG GAA GAC TTA CAC CGT CAT ATC TTC GAA CCA GAT GCA Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Pro Asp Ala His 420 425
CAT ACA GAA TCA GGC AAG ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Glu Arg Asp His Glu Thr Pro 225 230 235	AGT AAG CTG ATT GAG AAT TAC TGC CGA AAT CGA GAT GAT GAT CAT Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His 435 440 445
GAC CGG CAC AAA TTC TGC CCT GAA AGA IAT CCC GAC TTT GAT His Arg Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Glu Phe Asp 245 250 255	GGA CCC TGC TGC TAC ACG CGA AAT CCA CTC ATT CCT TGC GAT TAT TGC Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Cys Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr 450 455 460
GAT ATT ATT TGC CGC ATT CCC GAT GGC CAG CCC ARG CGA TGG TGC PAT Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Glu Gln Pro Asp Pro Trp Cys Tyr 260 265 270	CCT ATT TCT CGT IGT GAA GGT GAT ACC ACA ATT CTC ATT TTA Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Lys 465 470 475
ACT CCT GAC CCT CAC ACC CGC TGG GAG TAC TGT CGA ATT AAA AGA TGC Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Tyr Cys Ala Ile Iys Thr Cys 275 280 285	GAC CAT CCT CTA ATA TCT TGC CCC AAA AGC AAA CTC CGA GGT GAA Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Glu Asn Pro Leu Val 480 485 490
GCT GAC ATT ACT GTA ATT GAT ACT GAT CCT ATG GAA ACA ACT GAA Ala Asp Asn Thr Val Asn Asp Thr Asp Val Pro Met Val Thr Glu 290 295 300	AAT GGG ATT CCA ACA CGA ACA AAT GAA TGA TGC ATG ATT ACT TTG AGA Asn Glu Ile Pro Thr Arg Thr Asn Val Glu Trp Met Ile Val Ser Lys 500 505 510
TCT ATC CTA GGT CAA GEA GAA GGC TAC AGG GGC ACT GCC AAT ACC ATT Cys Ile Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Tyr Arg Glu 305 310 315	TAC AGA ATT AAA CAT ATC TGC GGA GGA TCA TGC AAA AGG GAA AGT TGG Tyr Arg Asn Lys Ile Cys Glu Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp 515 520 525
TGG ATT GCA ATT CCA TGT CAG CGT TGG GAT TCT CAG TAT CCT CAC MAG Trp Asn Glu Ile Pro Cys Glu Arg Asp Trp Asp Ser Glu Tyr Pro His Lys 320 325 330	GTT CCT ACT GCA CGA CAG TGT TTC CCT CCT TCT CGA GAC TTG AAA GAT TAT Val Leu Thr Ala Arg Glu Cys Ile Pro Ser Arg Leu Lys Asp Tyr 530 535 540
CAT GAC ATC ACT CCT GIA ATT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CGA GAA ATT His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Asp Leu Arg Asn 340 345 350	GAC GCT TGC CTC GGA ATT CAT GAT GTC CAT GGA AGA GAG GAA Cys Ala Ile Trp Leu Glu Ile His Asp Val His Glu Arg Glu Glu 545 550 555
TAC TGC CGA ATT CCA GAT CGG TGT GAA TCA CCC TGG TGT ATT ACC ACT Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Glu Ser Glu Ser Pro Trp Cys Asp 355 360 365	GCG MAN CGG GTT CTC ANT GAT TCC CAG CTC GIA ATT GGC CCT GAA GGA Arg Cys Glu Val Leu Asn Val Ser Glu Val Val Tyr Glu Pro Glu 565 570 585
GAT CCA AAC ATC CGA GTT GGT TAC TCC CAA ATT CCA AAC TGT GAT Asp Pro Asn Ile Arg Val Ile Cys Ser Glu Ile Pro Asn Cys Asp 370 375 380	TCA GAT CTC GTC ATT TTA ATG CTT GCC AGA CCT GCT GTC GAT GAT Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp 590 595 600
ATG TCA ATT GCA CAA GAT TGT TAT CGT GGG ATT CGC AAA ATT ATT ATG Met Ser Asn Glu Cys Tyr Arg Glu Asp Glu Lys Asn Tyr Met 385 390 395	TTC ATT ATT GAT TTA CCT MAT TAT GGA TGC ACA ATT CCT GAA Phe Val Asp Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Glu Cys Thr Ile Pro Glu 605 610 615
GCG AAC TTA TCC CAA ACA AGA TCT GGA CTA AGC TGT TCA ATG TGG AAC Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Cys Ser Met Trp Cys Ser 405 410	AAG ACC ACT TCC ACT GTT ATT GGC TGG GGC TAC ACT CGA TGC ATC AAC Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Glu Trp Cys Tyr Val Cys Ser 620 625 630

第4図(4) TAT GAT GGT CTA TTA CGA GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG 1920  
 Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu 625 630 640  
 AAA TGC AGC CAC CAT CAC CGA GGG AAG GTG ACT CTG AAT GAG TCT GAA 1968  
 Lys Cys Ser Glu His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu 645 650 655  
 ATA TGT GCT GGG GCT GAG AAG ATT GGA TCA CGA CCA TGT GAG GGG CAT 2016  
 Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp 660 665 670  
 TAT GGT GCC CCA CTG GTT TGT GAG CAA CAT AAA ATG AGA ATG GTT CTT 2064  
 Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Glu His Lys Met Arg Met Val Leu 675 680 685  
 GGT GTC ATT GTT CCC GCC CGT GGA TGC CCC ATT CCA AAT CGT CCT GGT 2112  
 Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly 690 695 700  
 ATT TTT GTC CGA GTA GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATT 2160  
 Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile 705 710 715 720  
 TTA ACA TAT AAC GTA CCA CAG TCA TAG  
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Glu Ser \*\*\*  
 725

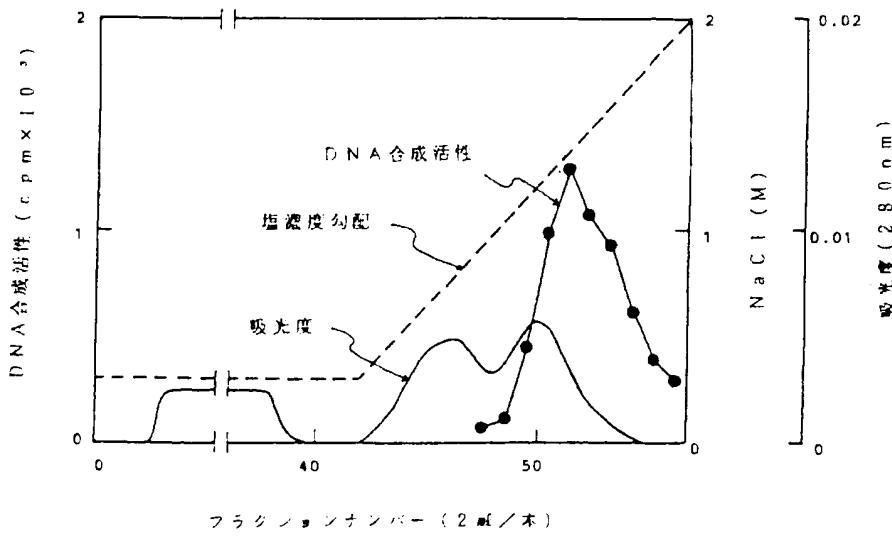




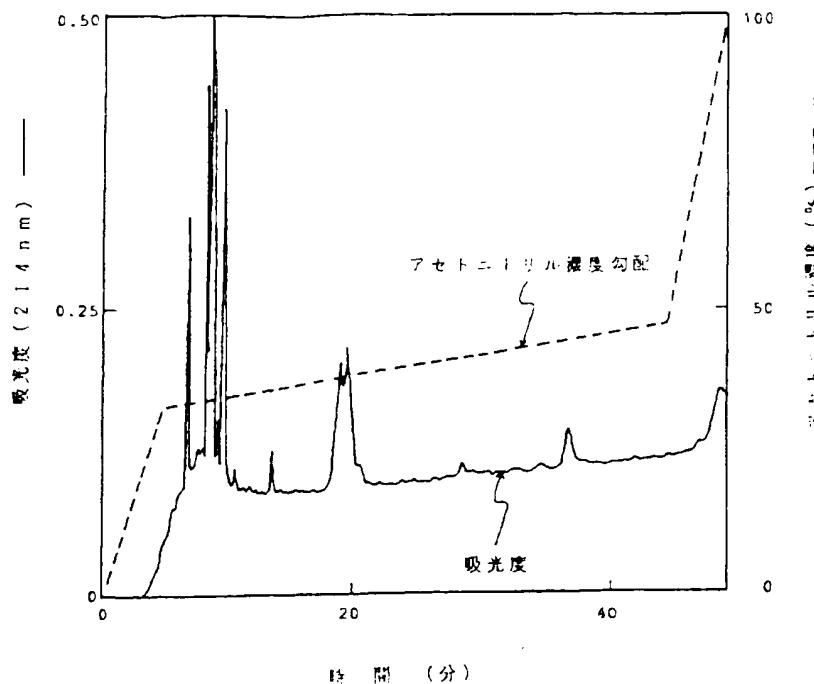
第6図



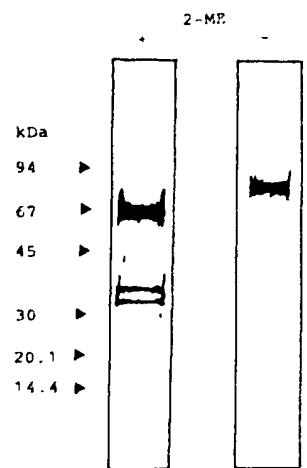
第9図



第10図



第11図



2-メルカブトエタノール還元：—  
非還元：—

第1頁の続き

⑥Int. Cl.<sup>1</sup>

C 12 N 5/10  
15/16  
C 12 P 21/02  
// A 61 K 37/02  
39/395  
(C 12 P 21/02  
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

ACS H 8214-4B  
D 8317-4C  
8829-4C

⑦発明者 下 西

学 滋賀県大津市桜野町1丁目20番36号 グリーンベル西大津  
A-203

⑦発明者 清 水

伸 京都府京都市左京区高野東開町1-23 27棟303号